

2002-365917/40 TAISHO PHARM CO LTD 2000.06.23 2000-190258(+2000JP-190258) (2002.01.08) C12N 15/09, C07K 14/47, C12Q 1/04, G01N 33/15, 33/53, 33/50, C12Q 1/68, C07K 16/18 A new gene and a protein encoded used for treating cerebral nerve diseases C2002-103692	B04 D16 *JP 2002000274-A B(4-E2F, 4-E3F, 4-G2, 4-H1, 11-C7A, 11-C10, 12-K4A5, 12-K4E, 14-J1, 14-N16) D(5-H9, 5-H11, 5-H12A, 5-H12B, 5-H17A2) .9
NOVELTY A protein (a) consisting of a defined amino acid sequence (S1) given in the specification. A protein (b) consists of S1 in which at least one amino acid is deleted, replaced or added in the amino acid and having guanine nucleotide exchanging factor activity.	(d) a DNA hybridizing with a DNA of S2 under a stringent condition and encoding a protein having guanine nucleotide exchanging factor activity. A DNA hybridizing with a DNA of S2 under a stringent condition and encoding a protein constituting a Lewy bodies. A DNA containing the base S6 shown in the specification, an antibody against the above protein, an antibody against an oligopeptide having part of the above protein and an antibody against one of the oligopeptides of S3 to S5. An agent for detecting Parkinson's disease containing the above antibody, a method for screening a compound inhibiting coagulation of the above protein or its salt, and a method for screening a compound promoting or inhibiting the expression of the above gene or its salt.

EXAMPLE A gene hucep-9 was cloned. (15pp097DwgNo.0/6)	
	JP 2002000274-A

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-274

(P2002-274A)

(43) 公開日 平成14年1月8日(2002.1.8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード(参考)
C 12 N 15/09	Z NA	C 07 K 14/47	2 G 0 4 5
C 07 K 14/47		16/18	4 B 0 2 4
16/18		C 12 Q 1/04	4 B 0 6 3
C 12 Q 1/04		1/68	A 4 H 0 4 5
1/68		G 01 N 33/15	Z

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-190258(P2000-190258)

(71) 出願人 000002819

大正製薬株式会社

東京都豊島区高田3丁目24番1号

(22) 出願日 平成12年6月23日(2000.6.23)

(72) 発明者 吉本 真

東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製

薬株式会社内

(72) 発明者 松本 佳代

東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製

薬株式会社内

(74) 代理人 100074114

弁理士 北川 富造

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規遺伝子及びそれにコードされる蛋白質

(57) 【要約】

【課題】 ヒト大脳皮質由来の新規蛋白質HUCEP-9と、それをコードする遺伝子hucep-9を提供する。

【解決手段】 ヒト大脳皮質由来のcDNAライブラリーからのクローニングによって新規蛋白質HUCEP-9をコードする遺伝子hucep-9が得られ、該遺伝子を有する発現ベクターによる形質転換体の培養により、新規蛋白質HUCEP-9が得られる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】以下の(a)または(b)の蛋白質；
(a)配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b)配列番号：1のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグアニンヌクレオチド交換因子活性を有する蛋白質。

【請求項 2】配列番号：1のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつレビー小体を構成する蛋白質。

【請求項 3】配列番号：3～5のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むペプチド。

【請求項 4】請求項1または2に記載の蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項 5】以下の(c)または(d)からなる遺伝子；

(c)配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNA；
(d)配列番号：2のDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ、グアニンヌクレオチド交換因子活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項 6】配列番号：2のDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ、レビー小体を構成する蛋白質をコードするDNA。

【請求項 7】配列番号：6に記載の塩基配列を含むDNA。

【請求項 8】請求項1または2に記載の蛋白質に対する抗体。

【請求項 9】請求項1または2に記載の蛋白質の1部を有するオリゴペプチドに対する抗体。

【請求項 10】配列番号3～5のいずれかに記載のオリゴペプチドに対する抗体。

【請求項 11】請求項9または10に記載の抗体を含有するパーキンソン病検査薬。

【請求項 12】請求項1または2に記載の蛋白質の凝集を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 13】請求項4～6のいずれかに記載の遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術】本発明は、パーキンソン病に関する蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、およびパーキンソン病の検出に有用な抗体に関するものである。

【0002】

【従来の技術】パーキンソン病は手足の震えといった運動異常を主な症状とする神経変性疾患の一つであり、日本では約10万人、米国では50万人以上の患者がいると言われている。1997年に家族性パーキンソン病の原因

遺伝子が同定され、これが以前からシナプス蛋白として知られていた α -synucleinに他ならないことが明らかになつた(Polymeropoulos M et al Science 276, 2045(1997))。

【0003】すなわち α -synucleinをコードする遺伝子に1塩基の変異が生じ、 α -synuclein蛋白に1アミノ酸の変異が導入されるとパーキンソン病が発症することが明らかになつた。 α -synucleinは前シナプスに存在する140残基からなる蛋白であるが(Maroteaux L et al J Neurosci 8, 2804(1988))、 α -synucleinに対する抗体がパーキンソン病の病理学的な特徴であるレビー小体と呼ばれる黒質神経細胞内封入体と反応することが明らかになつた(Spillantini MG et al Nature 388, 839(1997); Wakabayashi K et al Neurosci Letters 239:45(1997))。

【0004】またレビー小体中では α -synuclein自身が凝集していることも明らかになつた(Baba M et al Am J Pathol 152, 879(1998))。これらのことから少なくとも α -synucleinがレビー小体の成分であることが明らかになつたが、細胞内で α -synucleinを単独で過剰に発現させてもレビー小体は形成されない。また、 α -synucleinと相互作用する蛋白の一つとしてsynphilin-1がクローニングされた(Engelender S et al Nat Genet 22, 110(1999))。抗synphilin-1抗体もレビー小体と反応すること(Wakabayashi K et al Annals Neurol 47, 521(2000))などから、レビー小体形成には α -synuclein以外の蛋白も深く関与していることが強く示唆された。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、レビー小体中に存在する新規蛋白質、それをコードする遺伝子および該蛋白質の抗体を提供することを目的とする。

【0006】また、本発明は、該蛋白質の発現を調整する化合物や該蛋白質の凝集を阻害する化合物を見出すスクリーニング方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ヒト脳組織で特異的に発現している遺伝子にコードされている蛋白質を鋭意研究の結果、新規蛋白質（以下、HUCEP-9とする）とそれをコードする遺伝子（以下、hucep-9とする）の単離に成功した。さらに、

①HUCEP-9はグアニンヌクレオチド交換因子活性を有すること

②HUCEP-9に対する抗体を調製したところ、該抗体がパーキンソン病の病理学的な特徴であるレビー小体と反応することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】即ち、本発明は、(1) (a)配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる新規蛋白質HUCEP-9、または(b)配列番号：1のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、グアニンヌクレオチ

ド交換因子活性を有する蛋白質、(2)配列番号:1のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が消失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、レビー小体を構成する蛋白質、(3)配列番号:3~5のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むペプチド、(4)(1)または(2)に表された蛋白質をコードする遺伝子、(5)(c)配列番号:2に記載の塩基配列からなるDNA;または、(d)配列番号:2のDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ、グアニヌクレオチド交換因子活性を有する蛋白質をコードするDNA、(6)配列番号:2のDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ、レビー小体を構成するものであるDNA、(7)配列番号:6に記載の塩基配列を含むDNA、(8)(1)または(2)に記載の蛋白質に対する抗体、(9)(1)または(2)に記載の蛋白質の1部を有するオリゴペプチドに対する抗体、(10)(8)または(9)に記載の抗体を含有するパーキンソン病検査薬、(11)(1)又は(2)に記載の蛋白質の凝集を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(12)(4)~(6)のいずれかに記載の遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(13)(12)または(13)に記載のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩、である。

【0009】

【発明の実施の形態】遺伝子huccep-9は、ヒト大脳皮質由来のcDNAライブラリーから、該遺伝子を含んだcDNA断片として単離することができる。本発明者らが使用したcDNAライブラリーは、クローンテック社から市販されているヒト大脳皮質のmRNAをもとに調製したものであるが、ストラタジーン社から市販されているヒト大脳皮質のmRNAをもとにも、同様にcDNAを調製することができる。

【0010】上述のcDNAライブラリーにおいて、ヒト脳組織で特異的に発現している遺伝子を有すると思われるcDNAを識別する方法として、大久保らの方法(*kubo et al., Nature Genet., 2, 173(1992)*)による、遺伝子発現の出現頻度を解析する方法を用いることができる。具体的には、ヒト大脳皮質のmRNAを錠型とし、適当な制限酵素で開環させたベクタープラスミドの一端にオリゴdTを結合させたものをプライマーとしてcDNA合成を行った後、制限酵素MboIと制限酵素BamHIで切断する。当該ベクターはdamメチラーゼ陽性の大腸菌を宿主として調製されたため、MboIの認識配列である「GATC」のA残基がメチル化されている。従って、MboIは新たに合成されたcDNA部分のみを切断する。当該ベクターはオリゴdTを結合させた末端とは反対側の末端近傍にBamHI切断部位を1ヶ所だけ有しているので本酵素は当該ベクターを1ヶ所切断し、さらに新たに合成されたcDNA部分にもしB.

amHI認識配列が存在すれば、その部位も切断する。BamHIとMboIは「GATC」なる配列からなる、同一の付着端を生ぜしめるため、両酵素で切断した後、DNAリガーゼを作用させれば、プラスミドを閉環することができる。

【0011】本方法においてはこのようにして調製したプラスミドを用いて大腸菌を形質転換することによってcDNAライブラリーを構築した。従って当該ライブラリーは各mRNAの3'端のポリA部位から、その5'側部分のうち最初にGATCなる塩基配列が出現する部位までの領域を含んでいる。当該cDNAライブラリーから無作為に適当個数の組換え体を選択し、各組換え体中のcDNAを抽出してその全塩基配列を決定する。本法は、このようにして決定された特定配列を有するcDNA断片が、無作為に選択された組み換え体の中から幾つ確認されるかをもって、臓器特異的遺伝子および高発現遺伝子を識別する方法である。本法において、組み換え体cDNAの抽出並びにcDNAの塩基配列の決定は、いずれも当業者にとって自体公知の各種操作方法

(*Molecular Cloning, 2nd. ed., ColdSpring Harbor Laboratory Press, (1989)*、その他当業者にとって標準的な方法を紹介した技術解説書等に記載の方法、以下常法とする)により行うことができる。

【0012】尚、高発現遺伝子を識別する方法では、無作為に選択する組み換え体の総数は数百から千程度が適当であるが、必要ならばそれ以上の個数の組み換え体を処理すればよい。本発明者らは上記方法を実施し、770個の組み換え体中のcDNA断片の塩基配列を全て決定し、その中から、同一の配列を有するcDNAとしての出現頻度が2/770以上であったcDNA断片を、ヒト脳で特異的に発現している遺伝子を有するDNA断片の候補として選別した。

【0013】上記cDNA断片は前述したとおり、mRNAの3'端の一部の領域しか含んでいない。そこで本発明者らは当該領域(以下3'断片)の塩基配列情報を元にして、全鎖長cDNAを取得した。

【0014】これはクローンテック社から市販されているヒト大脳皮質cDNAライブラリーを錠型とし、上記3'断片内の配列を有する適当な長さのオリゴヌクレオチドとベクター中の配列を有する同程度の長さのオリゴヌクレオチドをそれぞれ合成し、これらをプライマーとして用いることによって、PCR法を用いて行った。その結果、約2.6kbのDNA断片を増幅することができた。この際、錠型としてはストラタジーン社から市販されているヒト大脳皮質cDNAライブラリーを用いることもできる。これはまた、クローンテック社またはストラタジーン社から市販されているヒト大脳皮質のmRNAを錠型とし、クローンテック社またはギブコ社の5'RACEキットを用いることによても行うことができる。さらにこれはまた、上記3'断片をプローブと

して、上記ヒト大脳皮質cDNAライブラリーをコロニーハイブリダイゼーションまたはブラークハイブリダイゼーションで、常法に従ってスクリーニングすることによっても行うことができる。

【0015】上記方法によって増幅したcDNA断片は、ノバジェン社から市販されているpT7Blue-Tベクターに組み込み、常法に従って全塩基配列を決定した。この際、組換えDNAを独立に2クローン取得して、それぞれのcDNA断片の塩基配列を決定することにより、配列の確認を行った。

【0016】上記方法によって選別したcDNA断片中に存在すると思われる遺伝子が、脳組織で特異的に発現していることの確認は、該cDNA配列の臓器特異的な発現頻度をノーザンハイブリダイゼーションで確認することで行うことができる。具体的には、クローンテック社またはストラタジーン社から市販されている、ヒトの各臓器から抽出したmRNAをアガロースゲル電気泳動で分画し、メンブレンフィルターに転写した後、上記方法によって選別したcDNA断片をプローブとして、常法に従ってハイブリダイゼーションを行った。本発明者らはこの方法を用い、該cDNA配列の発現についての臓器特異性を調べた。その結果、脳以外の他の臓器、器官、細胞等でも該cDNA配列の多少の発現が認められたものの、それに比べ大脳皮質で特異的に発現していたことを確認した。

【0017】このことは、該cDNA配列中に、ヒト脳で特異的に発現し正常な脳機能の維持に必須である所望の遺伝子が存在することを、強く示唆するものである。

【0018】塩基配列中の蛋白質をコードする領域(ORF, open reading frame)の存在は、塩基配列をコンピュータープログラムを用いて解析する汎用の方法により確認することができる。該cDNA配列の中に目的とする遺伝子の存在を確信した本発明者らは、コンピューターを利用して該配列中にORFを見だし、この遺伝子を遺伝子hucep-9(human cerebral proteinの略)、該遺伝子にコードされる蛋白質をHUCEP-9と命名した。

【0019】遺伝子hucep-9は、配列番号:2に示される2244塩基対(bp)からなる遺伝子である。この遺伝子hucep-9を用い、適当な宿主ベクター系による一般的な遺伝子組み換え技術によって、組み換え遺伝子を調製することができる。適当なベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pUC118その他)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pC194その他)、酵母由来のプラスミド(例、pSH19その他)、さらにバクテリオファージやレトロウイルスやワクシニアウイルス等の動物ウイルス等が利用できる。組み換えに際しては、適当な合成DNAアダプターを用いて翻訳開始コドンや翻訳終止コドンを付加することも可能である。さらに該遺

伝子を発現させるために、'遺伝子の上流に適当な発現プロモーターを接続する。使用するプロモーターは、宿主に応じて適宜選択すればよい。例えば、宿主が大腸菌である場合には、T7プロモーター、lacプロモーター、trpプロモーター、λPLプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合にはSPO系プロモーター等が、宿主が酵母である場合にはPHO5プロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター等が、宿主が動物細胞である場合にはSV40由来プロモーター、レトロウイルスプロモーター等が、それぞれ使用できる。

【0020】また該遺伝子を他の蛋白質(例、グルタチオンSトランスフェラーゼ、プロテインAその他)との融合蛋白質として発現させることも可能である。このようにして発現させた融合型HUCEP-9は、適当なプロテアーゼ(例、トリプシン、エンドロキナーゼその他)を用いて切り出すことが可能である。

【0021】hucep-9の発現の際に利用できる宿主としては、エシエリヒア属菌であるEscherichia coliの各種菌株、バチルス属菌であるBacillus subtilisの各種菌株、酵母としてはSaccharomyces cerevisiaeの各種菌株、動物細胞としてはCOS-7細胞、CHO細胞等が利用できる。

【0022】上記組み換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換する方法としては、常法または各宿主細胞に対して一般に用いられる形質転換方法が適用できる。

【0023】本発明である新規蛋白質HUCEP-9は、配列番号:1に示されるごとく、全アミノ酸747残基からなる分子量83921.2ダルトンの蛋白質である。また、アミノ酸配列上第242~297番目、及び第463~672番目にそれぞれRasグアニヌクレオチド交換因子モチーフが存在することがわかった。

【0024】尚、本発明においては、配列番号:2に示したDNA配列の他に、該DNAとハイブリダイズし、かつ、グアニヌクレオチド交換因子活性を有する蛋白質をコードするDNAについても、本発明の範囲内である。

【0025】グアニヌクレオチド交換因子活性とは、グアノシン二リン酸またはグアノシン三リン酸と結合する蛋白質からグアノシン二リン酸を除去しグアノシン三リン酸に交換する作用をいう。

【0026】また、配列番号:2に示したDNAとハイブリダイズし、かつ、レビー小体を構成する蛋白質をコードするDNAについても、本発明の範囲内である。

【0027】すなわち、遺伝子hucep-9の全長配列において、種々の人為的処理、例えば部位特異的変異導入、変異剤処理によるランダム変異、制限酵素切断によるDNA断片の変異・欠失・連結等により、部分的にDNA配列が変化したものであっても、これらDNA変異体が遺伝子hucep-9とストリンジェントな条件

下でハイブリダイズし、かつ、そこにコードされる蛋白質に対する抗体が後述するようにレビー小体との反応性を有するものであれば、配列番号：2に示したDNA配列との相違に関わらず、本発明の範囲内の中である。

【0028】上記のDNA変異の程度は、遺伝子h u c e p - 9のDNA配列と90%以上の相同性を有するものであれば許容範囲内である。また、遺伝子h u c e p - 9とハイブリダイズする程度としては、通常の条件下（例えば DIG DNA Labelingkit（ペーリンガー・マンハイム社製 Cat No. 1175033）でプローブをラベルした場合に、32℃のDIG Easy Hyb溶液（ペーリンガー・マンハイム社製 Cat No. 1803555）中でハイブリダイズさせ、50℃の0.5×SSC溶液（0.1% [w/v] SDSを含む）中でメンブレンを洗浄する条件（1×SSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウムである）でのサザンハイブリダイゼーションで、遺伝子h u c e p - 9にハイブリダイズする程度であればよい。

【0029】また、上記のごとく遺伝子h u c e p - 9と相同性の高い変異体遺伝子にコードされる蛋白質であって、グアニンヌクレオチド交換因子活性を有する、または該蛋白質に対する抗体がレビー小体との反応性を有する蛋白質もまた、本発明の範囲内のものである。

【0030】すなわち、新規蛋白質HUCEP-9のアミノ酸配列の1もしくは複数個のアミノ酸が消失、置換もしくは付加された変異体であっても、グアニンヌクレオチド交換因子活性を有するか、または該変異体に対する抗体がレビー小体と反応するものであれば、該変異体は本発明の範囲内である。

【0031】蛋白質の構成要素となるアミノ酸の側鎖は、疎水性、電荷、大きさなどにおいてそれぞれ異なるものであるが、実質的に蛋白質全体の3次元構造（立体構造とも言う）に影響を与えないという意味で保存性の高い幾つかの関係が、経験的にまた物理化学的な実測により知られている。例えば、アミノ酸残基の置換については、グリシン(Gly)とプロリン(Pro)、Glyとアラニン(Ala)またはバリン(Val)、ロイシン(Leu)とイソロイシン(Ile)、グルタミン酸(Glu)とグルタミン(Gln)、アスパラギン酸(Asp)とアスパラギン(Asn)、システイン(Cys)とスレオニン(Thr)、Thrとセリン(Ser)またはAla、リジン(Lys)とアルギニン(Arg)、等が挙げられる。

【0032】従って、配列番号：1に示した蛋白質HUCEP-9のアミノ酸配列上の置換、挿入、消失等による変異蛋白質であっても、その変異がHUCEP-9蛋白質の3次元構造において保存性が高い変異であって、その変異蛋白質がHUCEP-9と同様のグアニンヌクレオチド交換因子活性又は抗原性を有していれば、これらは本発明の範囲内にあるものと言うことができる。変

異の程度としては、配列番号：1に示したアミノ酸配列との相同性が、90%以上のものが許容し得る範囲である。

【0033】また本発明は、本発明の蛋白質HUCEP-9に対する抗体を用いることを特徴とするパーキンソン病の検出方法である。具体的には本発明は、HUCEP-9またはHUCEP-9の配列の一部を有するオリゴペプチドを抗原としてウサギ、ヤギ、ロバ、マウスなどの動物に投与し、公知の方法を用いて当該抗原に対する抗血清またはモノクローナル抗体を取得し、当該抗体を用いて病理標本を免疫組織染色することにより、当該標本を提供した患者がパーキンソン病であるか否かを検出する方法である。HUCEP-9の配列の一部を有するオリゴペプチドとは、例えばArg Ala Glu Gly Asn Pro Arg Gly Thr Asp Leu Glu Asn Pro Arg Glu（配列番号3）、Met Ala Arg Thr Ser Ser Arg Ala Pro Cys（配列番号4）、Asp Lys Leu Arg Arg Met Lys Ala Thr Phe Gln（配列番号5）をあげることができる。

【0034】さらにまた本発明は、HUCEP-9の凝集を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法である。

【0035】さらにまた本発明はh u c e p - 9の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法である。例えば、本遺伝子及びその上流領域を組み込んだ細胞に試験化合物を接触させて、接触させない場合に比べて本遺伝子に相補的なmRNA量が増加していれば、本遺伝子の発現を促進する物質として選択することができ、該mRNA量が減少していれば、本遺伝子の発現を阻害する物質として選択することができる。

【0036】

【発明の効果】HUCEP-9は、レビー小体中に存在し、グアニンヌクレオチド交換因子活性を有するため、パーキンソン病と関連するものと考えられる。したがつて、HUCEP-9を研究することにより新たな脳神経疾患治療薬に役立つことが期待される。

【0037】また、HUCEP-9と反応する抗体を調製することによりパーキンソン病の検査を行うことができる。

【0038】以下実施例を挙げて詳述するが、本発明はこの実施例に限定されることは言うまでもない。

【0039】

【実施例】実施例1 遺伝子h u c e p - 9のクローニング

1) 大脳の正常機能の維持に必須な遺伝子の部分配列の決定

ヒト大脳皮質のmRNA（クローンテック社）を鑄型として、大久保らの方法（Okubo et al. Nature Genet., 2, 173(1992)）により、大脳皮質のcDNAライブラリーを作成した。

【0040】次いで、当該ライブラリーから無作為に7

70個の組換え体を選択し、常法 (Molecular Cloning, 2nd. ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989、以下同じ) に従って、組換えDNAを抽出し、cDNA部分の3'側の塩基配列を決定した。配列決定にはPEアプライドバイオシステムズ社製のDNAシークエンサー (ABI PRISM377) と同社製反応キットを用いた。770個の組み換え体中の各DNA断片の発現頻度を解析した結果、図1に示す配列 (配列-1 : 配列番号7) を有する遺伝子の発現頻度が2/770であった。

2) 配列-1を含むcDNA断片の増幅

配列-1 (配列番号7) を含むcDNA断片の増幅を以下の方法により行った。

【0041】まず、配列-1の1部分と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド (図1 ; 配列-2 (配列番号8)) を、PEアプライドバイオシステムズ社製のDNA合成機 (ABI 380B) で合成した。次いで、ラムダファージクローニングベクター (λ DR2) のcDNA挿入部位近傍の配列を有するオリゴヌクレオチド (配列-3 : 配列番号9) を同様に合成した。 λ DR2をクローニングベクターとする、Human Brain cerebral cortex 5'-STRETCH cDNA library (クローンテックラボラトリーズ社製) を録型として、配列-2 (配列番号8) のオリゴヌクレオチドと配列-3 (配列番号9) のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行った。当該反応には宝酒造 (株) 製のキット (タカラ LA PCR Kit Ver.2) を用い、宝酒造 (株) 製のPCRサーマルサイクラーMPを使用した。

【0042】反応組成液

cDNA library (10^8 pfu/ml)	5 μ l
10×PCR緩衝液	5 μ l
2.5mM dNTP	1 μ l
10 μ M オリゴヌクレオチド (配列-2)	2 μ l
10 μ M オリゴヌクレオチド (配列-3)	2 μ l
水	34.5 μ l
LA DNAポリマーゼ	0.5 μ l
総量	50 μ l

反応条件

9.5℃で2分保持後、9.5℃で20秒間反応させ、5.8℃まで-1℃/2秒の速度で冷却し、5.8℃で1分間保持し、更に7.2℃で4分間保持した。これを3.5回繰り返して、目的配列を増幅させた。

【0043】上記方法により、配列-1の一部を有するDNA断片 (約2.6kb) を特異的に増幅させた (図2、図3)。

3) 塩基配列決定用ベクターへのサブクローニング
2) で増幅したDNAを、常法に従ってアガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度1%) で分画した。ゲルをエチジルプロマイドで染色した後、紫外光照射して目的とするバンドを含むゲルを切り出した。

【0044】アガロースゲルからのDNA断片の抽出と

精製は、GenecleanII Kit (バイオ101社製) を用いて行った。

【0045】この精製DNA断片を、塩基配列決定用ベクター、pT7Blue T-Vector (ノバジェン社製) にサブクローニングした。Ligation溶液は、宝酒造 (株) 製のキット (タカラ DNA Ligation Kit Ver.2) を用い、16℃で1.5時間反応させた。

【0046】上記反応溶液を用いて常法に従って大腸菌K12株DH5の形質転換を行った。

【0047】形質転換体をアンピシリン (Amp) 50 μ g/ml、5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) 40 μ g/ml、Isopropyl- β -D-1-thio-Galactopyranoside (IPTG) 100 μ Mを含有するLB寒天培地にプレーティングし、37℃で一晩培養した。

【0048】白色コロニーを50 μ g/mlのAmpを含むLB液体培地10mlに接種して37℃で一晩培養し、遠心分離によって菌体を集めた後、QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit (キヤゲン社製) で組換えDNAを精製した。このようにして構築した組換えDNAをpThucp-9と命名した。

4) DNA断片の塩基配列の決定

塩基配列決定にはPEアプライドバイオシステムズ社製のDNAシークエンサーを用い、ダイターミネーター法を用いた。決定された塩基配列を元にしてオリゴヌクレオチドを合成し、プライマーウオーキング法で全塩基配列を決定した。両鎖の塩基配列を決定した。当該クローニングのcDNAの全塩基配列を図3に示した。当該塩基配列が配列-2の相補鎖の上流を含んでいたことから、目的とする遺伝子 (human cerebral protein-9、hucp-9) がクローニングされたことを確認した。

【0049】当該cDNAは747残基より成る蛋白質 (HUCP-9) をコードする翻訳領域 (open reading frame、ORF) を含んでいる。

実施例2 抗HUCP-9抗体の調製

HUCP-9の配列の一部を有するオリゴペプチド (図1 ; 配列-4 (配列番号3)) をミリポア社製のペプチド合成機を用いて合成した。その際、C末端側にCys残基を付加したペプチドを合成し、該Cys残基を介して公知の方法を用いてKLH (Keyhole Limpet Hemocyanine) と結合させ、ウサギに免疫して抗血清を取得了。免疫後、経時に採血して血清を調製した。抗原として用いたペプチドを96穴のマイクロタイタープレートに固定し、ELISA法によって血清中の抗体価を測定した (図4)。抗体価が十分上昇したことを確認した後に、全採血して血清からプロテインAカラムクロマトグラフィーによりIgG画分を精製した。次いで抗原を結合させたカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより抗原特異的なIgG画分を精製した。当該画分の抗体価はELISA法によって測定した (図

5)。

実施例3 抗HUCEP-9抗体を用いた免疫組織染色

実施例2で調製したIgGを用い、公知の方法を用いて

ヒト脳組織の免疫染色を行ったところ、パーキンソン病

の病理学的特徴の一つであるレビー小体が強く染まった

(図6)。

【配列表】

<;110>;TAISHO PHARMACEUTICAL Co. Ltd.

<;120>;Novel Gene and Protein Ecoded Thereby

<;130>; 00TS-P3061

<;141>;2000-06-23

<;160>;2

<;210>;1

<;211>;747

<;212>;PRT

<;213>;HOMO SAPIENS

<;400>;1

Met Ala Arg Thr Ser Ser Arg Ala Pro Cys Ser Pro Thr Ser Val

5 10 15

Ser Asp Val Asp Ser Asp Ala Leu Ser Arg Gly Asn Phe Glu Val

20 25 30

Gly Phe Arg Pro Gln Arg Ser Val Lys Ala Glu Arg Ala Gln Gln

35 40 45

Pro Glu Ala Gly Glu Asp Arg Arg Pro Ala Gly Gly Ala Ser Asp

50 55 60

Val Glu Ala Val Thr Arg Leu Ala Arg Ser Lys Gly Val Gly Pro

65 70 75

Ala Leu Ser Pro Gly Pro Ala Gly Phe Gln Ser Cys Ser Pro Gly

80 85 90

Trp Cys Ser Ala Phe Tyr Glu Ala Asp Cys Phe Gly Ala Asp Val

95 100 105

His Asn Tyr Val Lys Asp Leu Gly Arg Gln Gln Ala Asp Gly Ala

110 115 120

Leu Pro Asp Ala Gln Ser Pro Glu Leu Glu Gln Gln Leu Met Met

125 130 135

Glu Lys Arg Asn Tyr Arg Lys Thr Leu Lys Phe Tyr Gln Lys Leu

140 145 150

Leu Gln Lys Glu Lys Arg Asn Lys Gly Ser Asp Val Lys Thr Met

155 160 165

Leu Ser Lys Leu Lys Gly Gln Leu Glu Glu Met Lys Ser Arg Val

170 175 180

Gln Phe Leu Ser Leu Val Lys Tyr Leu Gln Val Met Tyr Ala

185 190 195

Glu Arg Trp Gly Leu Glu Pro Cys Thr Leu Pro Val Ile Val Asn

200 205 210

Ile Ala Ala Ala Pro Cys Asp Thr Leu Asp Phe Ser Pro Leu Asp

215 220 225

Glu Ser Ser Ser Leu Ile Phe Tyr Asn Val Asn Lys His Pro Gly

230 235 240

Gly Arg Gln Lys Ala Arg Ile Leu Gln Ala Gly Thr Pro Leu Gly

245	250	255
Leu Met Ala Tyr Leu Tyr Ser Ser Asp Ala Phe Leu Glu Gly Tyr		
260	265	270
Val Gln Gln Phe Leu Tyr Thr Phe Arg Tyr Phe Cys Thr Pro His		
275	280	285
Asp Phe Leu His Phe Leu Leu Asp Arg Ile Asn Ser Thr Leu Thr		
290	295	300
Arg Ala His Gln Asp Pro Thr Ser Thr Phe Thr Lys Ile Tyr Arg		
305	310	315
Arg Ser Leu Cys Val Leu Gln Ala Trp Val Glu Asp Cys Tyr Ala		
320	325	330
Val Asp Phe Pro Arg Asn Ser Gly Leu Leu Gly Lys Leu Glu Asp		
335	340	345
Phe Ile Ser Ser Lys Ile Leu Pro Leu Asp Gly Ser Ala Lys His		
350	355	360
Leu Leu Gly Leu Leu Glu Val Gly Met Asp Arg Arg Ala Glu Gly		
365	370	375
Asn Pro Arg Gly Thr Asp Leu Glu Asn Pro Arg Glu Ala Glu Glu		
380	385	390
Asp Ala Arg Pro Phe Asn Ala Leu Cys Lys Arg Leu Ser Glu Asp		
395	400	405
Gly Ile Ser Arg Lys Ser Phe Pro Trp Arg Leu Pro Arg Gly Asn		
410	415	420
Gly Leu Val Leu Pro Pro His Lys Glu Arg Pro Tyr Thr Ile Ala		
425	430	435
Ala Ala Leu Pro Lys Pro Cys Phe Leu Glu Asp Phe Tyr Gly Pro		
440	445	450
Cys Ala Lys Thr Ser Glu Lys Gly Pro Tyr Phe Leu Thr Glu Tyr		
455	460	465
Ser Thr His Gln Leu Phe Ser Gln Leu Thr Leu Gln Gln Glu		
470	475	480
Leu Phe Gln Lys Cys His Pro Val His Phe Leu Asn Ser Arg Ala		
485	490	495
Leu Gly Val Met Asp Lys Ser Thr Ala Ile Pro Lys Ala Ser Ser		
500	505	510
Ser Glu Ser Leu Ser Ala Lys Thr Cys Ser Leu Phe Leu Pro Asn		
515	520	525
Tyr Val Gln Asp Lys Tyr Leu Leu Gln Leu Leu Arg Asn Ala Asp		
530	535	540
Asp Val Ser Thr Trp Val Ala Ala Glu Ile Val Thr Ser His Thr		
545	550	555
Ser Lys Leu Gln Val Asn Leu Leu Ser Lys Phe Leu Leu Ile Ala		
560	565	570
Lys Ser Cys Tyr Glu Gln Arg Asn Phe Ala Thr Ala Met Gln Ile		
575	580	585
Leu Ser Gly Leu Glu His Leu Ala Val Arg Gln Ser Pro Ala Trp		
590	595	600
Arg Ile Leu Pro Ala Lys Ile Ala Glu Val Met Glu Glu Leu Lys		
605	610	615

Ala Val Glu Val Phe Leu Lys Ser Asp Ser Leu Cys Leu Met Glu
 620 625 630
 Gly Arg Arg Phe Arg Ala Gln Pro Thr Leu Pro Ser Ala His Leu
 635 640 645
 Leu Ala Met His Ile Gln Gln Leu Glu Thr Gly Gly Phe Thr Met
 650 655 660
 Thr Asn Gly Ala His Arg Trp Ser Lys Leu Arg Asn Ile Ala Lys
 665 670 675
 Val Val Ser Gln Val His Ala Phe Gln Glu Asn Pro Tyr Thr Phe
 680 685 690
 Ser Pro Asp Pro Lys Leu Gln Ser Tyr Leu Lys Gln Arg Ile Ala
 695 700 705
 Arg Phe Ser Gly Ala Asp Ile Ser Thr Leu Ala Ala Asp Ser Arg
 710 715 720
 Ala Asn Phe His Gln Val Ser Ser Glu Lys His Ser Arg Lys Ile
 725 730 735
 Gln Asp Lys Leu Arg Arg Met Lys Ala Thr Phe Gln
 740 745 747

<;210>;2

<;211>;2244

<;212>;DNA

<;213>;HOMO SAPIENS

<;400>;2

atggccagga ccagcagcag ggccccctgc tcacccacct cgggtcgga tggactcg 60
 gacgcactgt cacggggaaa ctgcagggtg gggtttcggc ctcagaggc cgtaaaagcc 120
 gagagagcgc agcgcctga ggctggcag gacagacggc cagctggcgg ggcctcagac 180
 gtggaggcag tgacccgact ggccagggtcc aaagggtcg gcccagcctt gtccccggc 240
 ccagccggat tccagagctg cagcccccgc tggtcagcg cttctacga ggccgactgc 300
 ttccccccgc acgtccacaa ctacgtaaag gacctgggc ggcagcaggc ggacggggcc 360
 ctgcggcagc cccagagccc ggagctggaa cagcagtc tgatggagaa aagaaactac 420
 cgcaagaccc tgaagttcta ccagaaactc ttacagaagg aaaagaggaa caaaggttcc 480
 gacgtcaaga ccatgctgtc caagctaaaa gggcagctg aagaaatgaa atccagggt 540
 caattctca gcttggtcaa gaagtatctg caggtcatgt acgcgaacg ctggggcctg 600
 gagccctgca ccctcccaact gatcgtaaac atcgcggccg caccctgcga cacgtggac 660
 ttccggccccc tggacgatc ctccctgcgc atcttctaca acgtcaacaa gcaccggc 720
 ggccggcaga aggccgcata cctgcaggcc ggcacggc tggggctcat ggcctacgt 780

tactccagtg atgccttcct ggagggttat gtgcagcaat tcctctacac cttcgcgtac 840
 ttctgcacac cccacgactt cctgcacttc ctccctgcacc gcatcaacag cacgtgacc 900
 agggcccaccc aggacccac ctcgacccttc accaagatct acaggcggag cctctgcgtc 960
 ctgcaggcct gggtgagga ctgcgtacgt gtggacttcc ctcggaaacag cgggtgtctg 1020
 gggaaagctag aggacttcat ctccctcaag atcctacccc tggacggctc tgccaagcac 1080
 ctgcgtggcc tcctggaggt gggcatggac cggcggccg agggcaaccc tcgcggcaca 1140
 gaccctggaga accccagggaa ggcggaggag gatgccagac ccttcaacgc cctctgtaa 1200
 aggctcttag aggacggcat ctccaggaaag agcttccctt ggaggtgtcc ccgaggcaac 1260
 gggctggtc tgccgccaca caaggagcgc ccctacacca ttgctggcgc cctgcccac 1320
 ccctgttcc tcgaggactt ctacggcccc tgcgccaaga ccagtggaa gggccctac 1380
 ttccctgacgg agtacagcac tcaccagtc ttccggcgc tcacgtgtc acagcaggag 1440
 ttgtttcaaa agtgcaccc ggccacttc ctgaactcac gggccctggg cgtcatggac 1500

aagagcactg ccatccccaa agccagctct tctgagtc tttcgcccaa aacctgcage 1560
 ttatttctgc ccaattacgt tcaggacaag tatctgttac agcttctaag aaacgcagat 1620
 gacgtcagca cctgggtggc tgccatcgtt gtgaccagcc acaccctccaa gctgcagggt 1680
 aacctgcgtt ccaaaatccc gctgattcga aaatcttgct atgagcagag aaacttcgcg 1740
 acagccatgc agatccctgag cgggctggag cacctggccg tgaggcagtc ccctgcctgg 1800
 agaatttctgc ctgcaaaatgc agcagaggtc atggaggagc tgaaagccgt ggaggcttc 1860
 ctgaagagcg acagccctgtc tctgtatggaa gggcggcgct tccggccca gcccacccctg 1920
 ccctcgccccc acctccctggc catgcacatc cagcagctgg agacaggccg cttcaccatg 1980
 accaacgggg cccacaggtg gagcaagtc aggaacatcg caaaggttgt gagccagggt 2040
 caecgcgttcc aggagaaccc ttacacccttc agccccccgacc ccaagctcca gtcgtaccc 2100
 <:210>;3
 <:211>;16
 <:212>;PRT
 <:213>;Artificial Sequence
 <:400>;3
 Arg Ala Glu Gly Asn Pro Arg Gly Thr Asp Leu Glu Asn Pro Arg
 5 10 15
 Glu
 16
 <:210>;4
 <:211>;10
 <:212>;PRT
 <:213>;Artificial Sequence
 <:400>;4
 Met Ala Arg Thr Ser Ser Arg Ala Pro Cys
 5 10
 <:210>;5
 <:211>;10
 <:212>;PRT
 <:213>;Artificial Sequence
 <:400>;5
 Asp Lys Leu Arg Arg Met Lys Ala Thr Phe Gln
 5 10
 <:210>;6
 <:211>;48
 <:212>;DNA
 <:213>;Artificial Sequence
 <:400>;6
 cgggccgagg gcaaccctcg cggcacagac ctggagaacc ccagggag 48
 <:210>;7
 <:211>;298
 <:212>;DNA
 <:213>;HOMO SAPIENS
 <:400>;5
 gatccgaatc cgactgtggg gggcgccgtg ggaggtggga gccgcgtctc 60

```

aggcccggcc gttatcaagg cccctccgcc cccgaaccct ggggagctgg 120
accaggaggt ggaggcgtcg gggacccat ggggacaggc agagctggtc 180
tcctcccgac agacgggcc aggacggca caagagtctt ggaggttgc 240
gtgtttctgc tagaattaaa aagttaaatt taaaaatgaa aatgnaaa 298
<;210>;8
<;211>;30
<;212>;DNA
<;213>;Artificial Sequence
<;400>;6
.cctccaagac tcttgtgccc gtcctggctc 30
<;210>;9
<;211>;27
<;212>;DNA
<;213>;Artificial Sequence
<;400>;7
cgaaccactg aattccgcat tgcagag 27

```

【図面の簡単な説明】

【図1】図1の配列-1は大脳皮質のcDNAライブラリーより得られる組み換え体中で高い発現頻度を示すDNA断片を表わし、配列-2～3は配列-1を含むDNA断片のクローニングに用いたオリゴヌクレオチドを示す。配列-2は配列-1の部分配列であり、配列-3はクローニングに用いたcDNAライブラリーのベクターであるラムダDR2の部分配列である。配列-4は抗原

として用いたオリゴペプチドの配列を表す。

【図2】遺伝子huccep-9を含むDNA断片の塩基配列(1)

【図3】遺伝子huccep-9を含むDNA断片の塩基配列(2)

【図4】抗体価の上昇を示すグラフ。

【図5】抗原特異的IgGの精製の結果を示すグラフ。

【図6】免疫組織染色結果を示す。

【図1】

【図1】

配列-1

```

gaiccgaaatccgactgtggggggcgccgtgggagggtgggagccgcgtc
aggccccggccgttatcaaggcccccccgccccccgaaacctggggagctgg
accaggagggtggaggctcaggggacccatgggacaggcagagctggc
tcctcccgagcagacggagccaggacggcacaagagtcttgagggttgc
gtgtttctgtagaattaaaatggatggatggatggatggatggatggatgg

```

配列-2

```
cctccaagactttgtggccgtccgtggc
```

配列-3

```
cgaaccactgaaatccgcattgcagag
```

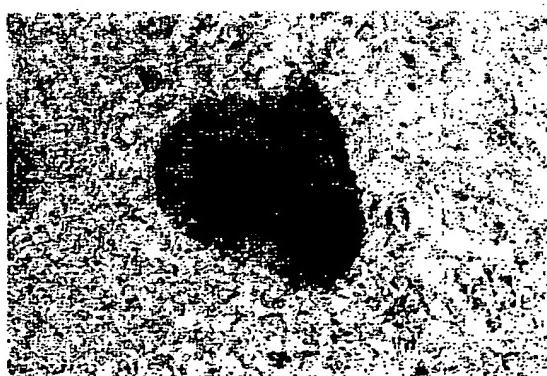
配列-4

```
Arg Ala Glu Gly Asn Pro Arg Gly Thr Asp Leu Glu Asn Pro Arg Glu
```

【图2】

[図 2-1]

【图6】

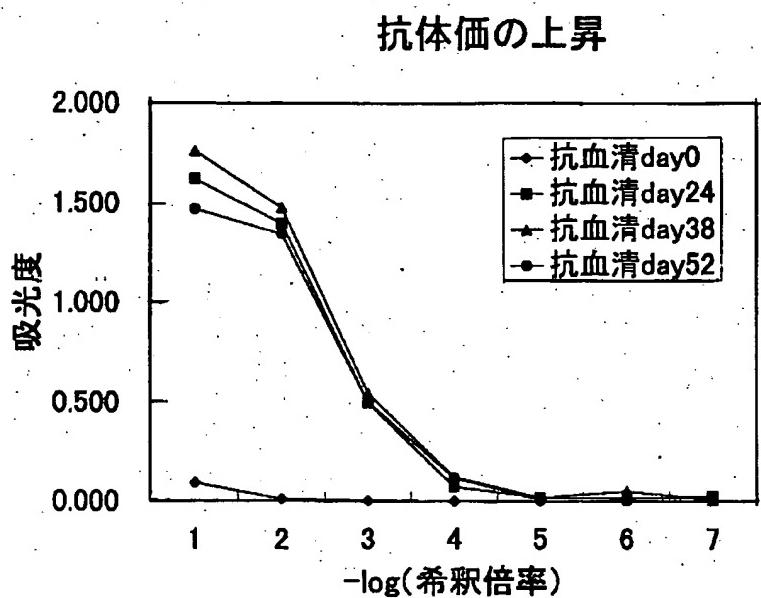


【图3】

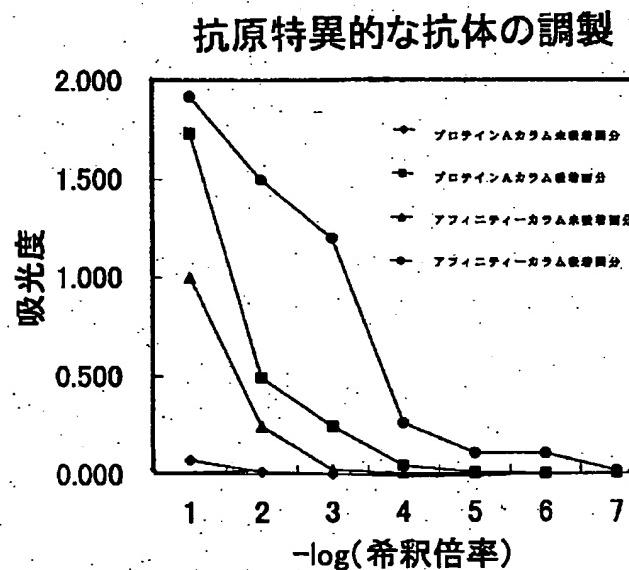
[图 2-2]

2477.

【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

G 0 1 N 33/15

33/50

33/53

識別記号

F I

G 0 1 N 33/50

33/53

C 1 2 N 15/00

マーコード (参考)

T

Z

D

Z N A A

(72)発明者 齋藤 まどか
東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製
薬株式会社内

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA34 AA35 AA40 DA12
DA13 DA14 DA36 DA77 FB02
FB03
4B024 AA01 AA11 BA61 BA80 CA01
CA04 HA01 HA11 HA15
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ79
QQ96 QR32 QR40 QR48 QS15
QS33
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA45 DA75 DA86 EA50 FA71
FA74 GA26